

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 12 月 6 日 (06.12.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/92482 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 5/10, 15/09 府吹田市桃山台 4-3-10-113 Osaka (JP). 澤本和延 (SAWAMOTO, Kazunobu) [JP/JP]; 〒569-1022 大阪府高槻市日吉台四番町20番32号 Osaka (JP). 小林和人 (KOBAYASHI, Kazuto) [JP/JP]; 〒960-8157 福島県福島市蓬萊町7丁目10番地2-3D Fukushima (JP). 松下夏樹 (MATSUSHITA, Natsuki) [JP/JP]; 〒960-8055 福島県福島市野田町6-10-30 サンテ・ルミエル202号 Fukushima (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/08674
- (22) 国際出願日: 2000 年 12 月 7 日 (07.12.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2000-165150 2000 年 6 月 1 日 (01.06.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 弁理士 西澤利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒150-0042 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): CA, US.
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 岡野栄之 (OKANO, Hideyuki) [JP/JP]; 〒565-0854 大阪
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF CONCENTRATING AND SEPARATING DOPAMINERGIC NEURONS

(54) 発明の名称: ドーパミン作動性ニューロンの濃縮・分離方法

(57) Abstract: A method which comprises transferring reporter nucleic acid molecules, which express a fluorescent protein under the regulation by the promoter/enhancer of a gene expressed in dopaminergic neurons, into individual cells of a cell mass and separating fluorescing cells from this cell mass. A method which comprises transferring the above-described reporter nucleic acid molecules into individual cells of a cell mass and measuring the fluorescence distribution of the cell mass to thereby visualize and identify the dopaminergic neurons occurring in the cell mass in a viable state. A method of identifying a dopaminergic neuron inductive factor which comprises transferring a reporter nucleic acid molecule into cells capable of differentiating into dopaminergic neurons, allowing these cells to coexist with a candidate substance and then determining whether or not the candidate substance is a dopaminergic neuron inductive factor with the use of the fluorescence of the cells as an indication.

[続葉有]

WO 01/92482 A1



(57) 要約:

この出願の発明は、ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子のプロモーター／エンハンサーの制御下で蛍光タンパク質を発現するレポーター核酸分子を、細胞集団の各細胞に導入し、この細胞集団から、蛍光を発する細胞を分離する方法を提供する。またこの出願の発明は、前記レポーター核酸分子を細胞集団の各細胞に導入し、この細胞集団の蛍光分布を測定することによって、細胞集団に存在するドーパミン作動性ニューロンを生きたまま可視化、同定する方法を提供する。さらにこの出願の発明は、ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞にレポーター核酸分子を細胞に導入し、この細胞と候補物質とを共存させ、細胞の蛍光を指標として候補物質がドーパミン作動性ニューロン誘導因子か否かを決定するドーパミン作動性ニューロン誘導因子の同定方法を提供する。

明細書

ドーパミン作動性ニューロンの濃縮・分離方法

5 技術分野

この出願の発明は、ドーパミン作動性ニューロンの濃縮・分離方法に関するものである。さらに詳しくは、パーキンソン病等の治療のための移植細胞として、またそれら疾患の治療法開発のための研究材料として有用なドーパミン作動性ニューロンを同定し、効率よく確実に濃縮し分離する方法に関するものである。

10

背景技術

パーキンソン病は、中脳黒質のドーパミン作動性ニューロンが選択的に変性脱落することによって発症する疾患である。その治療には、ドーパミン作動性ニューロン（またはドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞）を多く含む胎児中脳組織を患者の脳内（線条体）に移植することの有効性が証明されている。

15

しかしながら、通常の臨床使用に十分な量の胎児脳組織を確保することは、実際上は不可能である。このため、胎児中脳に替わるドナー細胞が求められている。

20 例えば、多数の未分化な神経系細胞からドーパミン作動性ニューロンへと分化した細胞を移植用のドナー細胞として使用することが検討されている。さらに、ES 細胞や骨髄間質細胞などの非神経系細胞からドーパミン作動性ニューロンへと分化させた細胞を移植用のドナー細胞として使用することも検討されている。これらの細胞は試験管内で増殖させた後に分化誘導することができるので、ドナー不足の問題
25 を解決する手段となりうる。さらに、骨髄間質細胞は成人から安全に採取することが可能であるため、患者自身の細胞から移植用のドーパミン作動性ニューロンを調製することが可能である。従って、このような治療方法が実現すれば、ドナー不足の問題や拒絶反応等の技術的な問題が解決されるだけでなく、ドーパミン作動性ニ

ニューロンを中絶胎児から得ることによる倫理的な問題も解決される。

しかしながら、未分化な細胞集団からドーパミン作動性ニューロンを効率よく分化させる方法は十分に確立されていない。また、未分化な細胞集団からは、ドーパミン作動性ニューロン以外の各種細胞が分化する。さらに、未分化な細胞集団の中には移植後に腫瘍を形成する細胞が含まれている危険性がある。従って、試験管内で分化させたドーパミン作動性ニューロンを移植用に用いるためには、多種類の細胞集団からドーパミン作動性ニューロンを選択的に分離する必要がある。

10 前記のとおり、濃縮されたドーパミン作動性ニューロンは、パーキンソン病等の治療用の移植ドナー細胞としての有用性が期待されている。また、ドーパミン作動性ニューロンを濃縮・分離することは、このニューロンで特異的に発現する新規タンパク質や遺伝子の同定にも極めて有用である。これらのタンパク質やその遺伝子は新規の治療薬が期待されるからである。

15

また、未分化な細胞からドーパミン作動性ニューロンを試験管内で分化させる因子を同定することは極めて重要である。そのような因子は、未分化な細胞からドーパミン作動性ニューロンを効率よく誘導するために役立つだけでなく、その因子そのものが新規の治療薬となりうるのが期待されるからである。

20

しかしながら、ドーパミン作動性ニューロンを生体組織または培養条件下の細胞集団から分離する方法は未だ確立されていない。

さらに、ドーパミン作動性ニューロンを試験管内で誘導する因子を探索する方法は25 勿論のこと、そのような探索に必要なドーパミン作動性ニューロンを生きたまま可視化する方法も未だ確立されていない。

この出願の発明は、多種多様な細胞によって構成されている細胞集団の中のドー

パミン作動性ニューロンを生きたまま可視化し、そのドーパミン作動性ニューロンを高い割合で濃縮し、分離する方法を提供することを課題としている。

また、この出願の発明は、その方法によって分離されたドーパミン作動性ニューロンを提供することも課題としている。

さらにこの出願の発明は、未分化な細胞をドーパミン作動性ニューロンへと分化誘導する因子を特定する方法を提供することを課題としてもいる。

10 発明の開示

この出願は、第1の発明として、細胞集団から、ドーパミン作動性ニューロンを分離する方法であって、ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子のプロモーター／エンハンサーの制御下で蛍光タンパク質を発現するレポーター核酸分子を細胞集団の各細胞に導入し、この細胞集団から、蛍光を発する細胞を分離することを特徴とするドーパミン作動性ニューロンの濃縮・分離方法を提供する。

この出願はまた、第2の発明として、前記第1発明の方法により濃縮・分離され、培養条件下に保持された細胞を提供する。

またこの出願は、第3の発明として、細胞集団に存在するドーパミン作動性ニューロンを生きたまま可視化、同定する方法であって、ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子のプロモーター／エンハンサーの制御下で蛍光タンパク質を発現するレポーター核酸分子を細胞集団の各細胞に導入し、この細胞集団の蛍光分布を測定することを特徴とするドーパミン作動性ニューロンの同定方法を提供する。

さらにこの出願は、第4の発明として、ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞をドーパミン作動性ニューロンへと誘導する因子を同定する方法であって、ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子のプロモーター／エンハンサ

一の制御下で蛍光タンパク質を発現するレポーター核酸分子を細胞に導入し、この細胞と候補物質とを共存させ、細胞の蛍光を指標として候補物質がドーパミン作動性ニューロン誘導因子か否かを決定するドーパミン作動性ニューロン誘導因子の同定方法を提供する。

5

前記第1および第3の各発明方法においては、以下を好ましい態様としている。

ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子が、チロシンハイドロキシラーゼ遺伝子であること。

10

蛍光タンパク質が、グリーン蛍光タンパク質であること。

細胞集団の各細胞が、脳由来であること。

15 細胞集団の各細胞が、ES細胞であること。

細胞集団の各細胞が、骨髄間質細胞由来であること。

細胞集団の各細胞が、ヒト由来であること。

20

細胞集団の各細胞が、レポーター核酸分子を保有する組換えベクターを導入された細胞であること。

25 細胞集団が、レポーター核酸分子を導入した非ヒト動物の全能性細胞を個体発生させた動物またはその子孫動物由来であること。

また、前記第1発明においては、蛍光を発する細胞を、セルソーターを用いて濃縮・分離することを好ましい態様としている。

さらに、前記第3発明においては、以下を好ましい態様としている。

ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子が、チロシンハイドロキシラーゼ
5 遺伝子であること。

蛍光タンパク質が、グリーン蛍光タンパク質であること。

10 ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞が、神経幹細胞であること。

ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞が、ES細胞であること。

15 ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞が、骨髄間質細胞であること。

ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞が、ヒト由来であること。

20 ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞が、レポーター核酸分子を
保有する組換えベクターを導入された細胞であること。

ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞が、レポーター核酸分子を
導入した非ヒト動物の全能性細胞を個体発生させた動物またはその子孫動物由来で
あること。

25 図面の簡単な説明

図1は、TH-EGFP トランスジェニックマウスの胎仔中脳から得た細胞分散液の
FACS解析の結果である。

図 2 は、細胞分散液の全細胞 (A) および FACS により得た細胞 (B) のそれぞれの GFP 蛍光と TH 遺伝子発現を解析した結果である。

発明を実施するための最良の形態

- 5 第 1 発明は、ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子のプロモーター／エンハンサーの制御下で蛍光タンパク質を発現するレポーター核酸分子を、動物由来の細胞集団の各細胞に導入し、この細胞集団から、蛍光を発する細胞を分離することを特徴とする方法である。
- 10 細胞集団の細胞に導入するレポーター核酸分子は、ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子のプロモーター／エンハンサーをコードするポリヌクレオチド配列と、このポリヌクレオチド配列の下流に、蛍光タンパク質をコードするポリヌクレオチドを連結した融合核酸分子である。
- 15 ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子のプロモーター／エンハンサーとしては、様々な動物種のチロシンヒドロキシラーゼ (TH) 遺伝子のプロモーター配列を使用することができるが、特にラット TH 遺伝子のプロモーターが好ましい。このラット TH 遺伝子プロモーター配列は、GenBank Accession No.AF069036 として登録されており、この公知の配列に基づき合成したプローブを用いてラットゲノムライブラリーをスクリーニングする方法、または合成プライマーを用いた PCR 法
- 20 等により取得、利用することができる。

蛍光タンパク質としては、オワンクラゲ由来のグリーン蛍光タンパク質 (GFP)、イソギンチャク由来のレッド蛍光タンパク質 (RFP) 等を利用することができるが、

25 特に GFP あるいは GFP 誘導体 (例えば、Current Biology 6(2):178-182, 1996 に記載の誘導体) の使用が好ましい。なお、GFP をコードするポリヌクレオチドとしては、その cDNA (Gene 111(2):229-233, 1990 : GenBank No. M62654) が知られている。また、EGFP cDNA のクローン (EGFP Poly(A) : Clontech 社製) を利用する

こともできる。

レポーター核酸分子を導入する細胞は、ヒトを含めた動物の脳由来の分化した神経系細胞を対象とすることができる。あるいは、ドーパミン作動性ニューロンへの
5 分化能を有する神経幹細胞、ES 細胞、骨髄間質細胞等を試験管内で分化誘導したドーパミン作動性ニューロンを対象とすることもできる。これらの未分化な細胞からドーパミン作動性ニューロンを分化誘導するには、公知の方法（例えば、神経幹細胞：Nat. Neurosci. 1: 290-295, 1998、ES 細胞：Nat. Biotechnol. 18: 675-679, 2000 および Neuron 28: 31-40, 2000）に従うことができる。

10

レポーター核酸分子を細胞に導入するには、このレポーター核酸分子を組み込んだ発現ベクターを個々の培養細胞に導入する方法を採用することができる。発現ベクターとしては、動物細胞発現用のプラスミドベクターを使用することができる。このようなプラスミドベクターを細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAE デキストラン法を採用することができる。また、アデ
15 ノウイルスベクター等のウイルスベクターを細胞に感染させる方法を利用することもできる。

あるいはまた、非ヒト動物を対象とする場合には、レポーター核酸分子を導入したトランスジェニック動物を作成することによって、細胞にレポーター核酸分子を導入するようにしてもよい。トランスジェニック動物は、公知の作成法（例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7380-7384, 1980）に従って作成することができる。このようなトランスジェニック非ヒト動物は、全ての体細胞にレポーター核酸分子を保有しているため、その中枢神経系組織を取り出し、蛍光シグナルを発する細胞
25 を単離することによって、ドーパミン作動性ニューロンを大量に取得することができる。

前記の方法によってレポーター核酸分子を導入した細胞集団から、ドーパミン作

動性ニューロンを濃縮・分離するには、蛍光顕微鏡によって培養細胞から蛍光シグナルを発する細胞を１個ずつ分離することも可能であるが、作業の大幅な効率化のためには、セルソーター（蛍光活性化セルソーター：FACS）を使用する方法が好ましい。このセルソーターによって、ドーパミン作動性ニューロンを自動的に濃縮・

5 分離することが可能である。

第３発明の方法は、前記レポーター核酸分子を細胞集団の各細胞に導入し、この細胞集団の蛍光分布を測定することによって、細胞集団に存在するドーパミン作動性ニューロンを生きたまま可視化、同定する方法である。材料や核酸分子導入方法

10 は、基本的に第１発明と同一とすることができる。レポーター酢酸分子を導入した細胞集団を顕微鏡で観察することにより、蛍光分布としてドーパミン作動性ニューロンを可視化、同定することができる。

第４発明の方法は、ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞にレポーター核酸分子を細胞に導入し、この細胞と候補物質とを共存させ、細胞の蛍光を指標として候補物質がドーパミン作動性ニューロン誘導因子か否かを決定するドーパミン作動性ニューロン誘導因子の同定方法である。ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞は、神経幹細胞、ES細胞、骨髄間質細胞等である。前記第

15 １発明と同じレポーター核酸分子をこれらの未分化細胞に導入し、細胞の培地中に候補物質を添加する。候補物質が未分化細胞をドーパミン作動性ニューロンへと誘導するか否かは、前記第２発明の方法によって容易に確認することができる。

20

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

25

実施例

１．トランスジェニックマウスの作成

ラット TH 遺伝子のプロモーター配列の制御下で GFP を発現するベクター（RTH

ーGFP) を構築した。すなわち、ドーパミン作動性ニューロンで特異的に発現することが知られているラット TH 遺伝子上流 10 kb のプロモーター配列 (Mol. Brain Res. 27:281-289, 1994; Mol. Cells 7:394-398, 1997) を EGFP cDNA (Clontech 社製) の上流に挿入して導入ベクターを構築した。次に、この組換えベクターを開列して直鎖状とし、C57BL/6J マウスと DBA/2J マウスとの F1 マウス由来の受精卵前核に注入した。遺伝子導入受精卵は常法に従って仮親の卵管に移植し、個体へと発生させ、TH-EGFP トランスジェニックマウスを作成した。

2. 細胞分散液の調製

TH-EGFP マウスの雄を野生型マウスと交配し、胎生 12 日目の胎仔の中脳腹側部を切り取り、この組織をトリプシン・EDTA 溶液中で処理した後、ピペッティングにより細胞を分散させた。この細胞を 24 時間培養した後、抗 TH 抗体およびテキサスレッド標識 2 次抗体と反応させて解析した結果、GFP 陽性抗体の約半分以上が TH 陽性のドーパミン作動性ニューロンであることが確認された。

3. セルソーターによるドーパミン作動性ニューロンの濃縮・分離

前記 2 で得た細胞分散液に propidium iodide を添加し、ナイロンメッシュをとおして未消化の組織片を除去した後、FACS Vantage (ベクトンディッキンソン社) を用いて解析した。その結果、図 1 に示したように、細胞分散液に含まれている細胞のうち 7 % の細胞が蛍光シグナルを示した。

次いで、propidium iodide 陰性 (生細胞) で、GFP の蛍光を発する細胞を試験管に集めた。集めた細胞をカバーガラスに接着させ、前記 2 と同様の方法により抗体との反応性を解析した。その結果、図 2 (B) に示したように、ほとんど全ての細胞が GFP 陽性であり、その約 TH 陽性 (ドーパミン作動性ニューロン) であることが確認された。

4. 前記 3 で得た細胞を、6-OHDA によって作製したパーキンソンモデルラットの線条体へ移植した。5 週間後にアンフェタミン投与によって引き起こされる回転運

動を解析したところ、全ての個体で有意な症状の改善が観察された。

産業上の利用可能性

5 以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、様々な種類の細胞によつて構成される細胞集団からドーパミン作動性ニューロンを濃縮・分離する方法と、この方法によって高度に濃縮されたドーパミン作動性ニューロンが提供される。この細胞は、ヒトのパーキンソン病等の治療材料（移植用細胞）として有用であるばかりか、パーキンソン病の病因および病態解析、並びにその治療技術や治療薬等の開発に有用である。さらに、この出願の発明によって、ドーパミン作動性ニューロ
10 ンを生きたまま可視化、同定する方法と、この方法を用いてドーパミン作動性ニューロン分化誘導因子を同定する方法が提供される。これらの方法によって、パーキンソン病等の移植用細胞を未分化細胞から効率よく取得することが可能となる。また、ドーパミン作動性ニューロン分化誘導因子は新たな治療薬の開発に有用である。

請求の範囲

1. 細胞集団から、ドーパミン作動性ニューロンを分離する方法であって、ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子のプロモーター／エンハンサーの制御下
5 で蛍光タンパク質を発現するレポーター核酸分子を細胞集団の各細胞に導入し、この細胞集団から、蛍光を発する細胞を分離することを特徴とするドーパミン作動性ニューロンの濃縮・分離方法。
2. ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子が、チロシンヒドロキシラー
10 ーゼ遺伝子である請求項1の方法。
3. 蛍光タンパク質が、グリーン蛍光タンパク質である請求項1の方法。
4. 細胞集団の各細胞が、脳由来である請求項1の方法。
15
5. 細胞集団の各細胞が、ES細胞由来である請求項1の方法。
6. 細胞集団の各細胞が、骨髄間質細胞由来である請求項1の方法。
- 20 7. 細胞集団の各細胞が、ヒト由来である請求項1、4、5または6の方法。
8. 細胞集団の各細胞が、レポーター核酸分子を保有する組換えベクターを導入された細胞である請求項1から7のいずれかの方法。
- 25 9. 細胞集団の各細胞が、レポーター核酸分子を導入した非ヒト動物の全能性細胞を個体発生させた動物またはその子孫動物由来である請求項1から6のいずれかの方法。

10. 蛍光を発する細胞を、セルソーターを用いて濃縮・分離する請求項 1 から 9 のいずれかの方法。

11. 請求項 1 から 10 のいずれかの方法により濃縮・分離され、培養条件下に保持
5 された細胞。

12. 細胞集団に存在するドーパミン作動性ニューロンを生きたまま同定する方法
であって、ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子のプロモーター／エンハ
ンサーの制御下で蛍光タンパク質を発現するレポーター核酸分子を細胞集団の各細
10 胞に導入し、この細胞集団の蛍光分布を測定することを特徴とするドーパミン作動
性ニューロンの同定方法。

13. ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子が、チロシンヒドロキシラ
ーゼ遺伝子である請求項 12 の方法。

15

14. 蛍光タンパク質が、グリーン蛍光タンパク質である請求項 12 の方法。

15. 細胞集団の各細胞が、脳由来である請求項 12 の方法。

20 16. 細胞集団の各細胞が、ES 細胞由来である請求項 12 の方法。

17. 細胞集団の各細胞が、骨髄間質細胞由来である請求項 12 の方法。

18. 細胞集団の各細胞が、ヒト由来である請求項 12、15、16 または 17 の方法。

25

19. 細胞集団の各細胞が、レポーター核酸分子を保有する組換えベクターを導入
された細胞である請求項 12 から 18 のいずれかの方法。

20. 細胞集団の各細胞が、レポーター核酸分子を導入した非ヒト動物の全能性細胞を個体発生させた動物またはその子孫動物由来である請求項 12 から 17 のいずれかの方法。

- 5 21. ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞をドーパミン作動性ニューロンへと誘導する因子を同定する方法であって、ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子のプロモーター／エンハンサーの制御下で蛍光タンパク質を発現するレポーター核酸分子を細胞に導入し、この細胞と候補物質とを共存させ、細胞の蛍光を指標として候補物質がドーパミン作動性ニューロン誘導因子か否かを決定
10 するドーパミン作動性ニューロン誘導因子の同定方法。

22. ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子が、チロシンハイドロキシラーゼ遺伝子である請求項 21 の方法。

- 15 23. 蛍光タンパク質が、グリーン蛍光タンパク質である請求項 21 の方法。

24. ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞が、神経幹細胞である請求項 21 の方法。

- 20 25. ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞が、ES 細胞である請求項 21 の方法。

26. ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞が、骨髄間質細胞である請求項 21 の方法。

25

27. ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞が、ヒト由来である請求項 21、24、25 または 26 の方法。

28. ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞が、レポーター核酸分子を保有する組換えベクターを導入された細胞である請求項 21 から 27 のいずれかの方法。
- 5 29. ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞が、レポーター核酸分子を導入した非ヒト動物の全能性細胞を個体発生させた動物またはその子孫動物由来である請求項 21 から 26 のいずれかの方法。

1

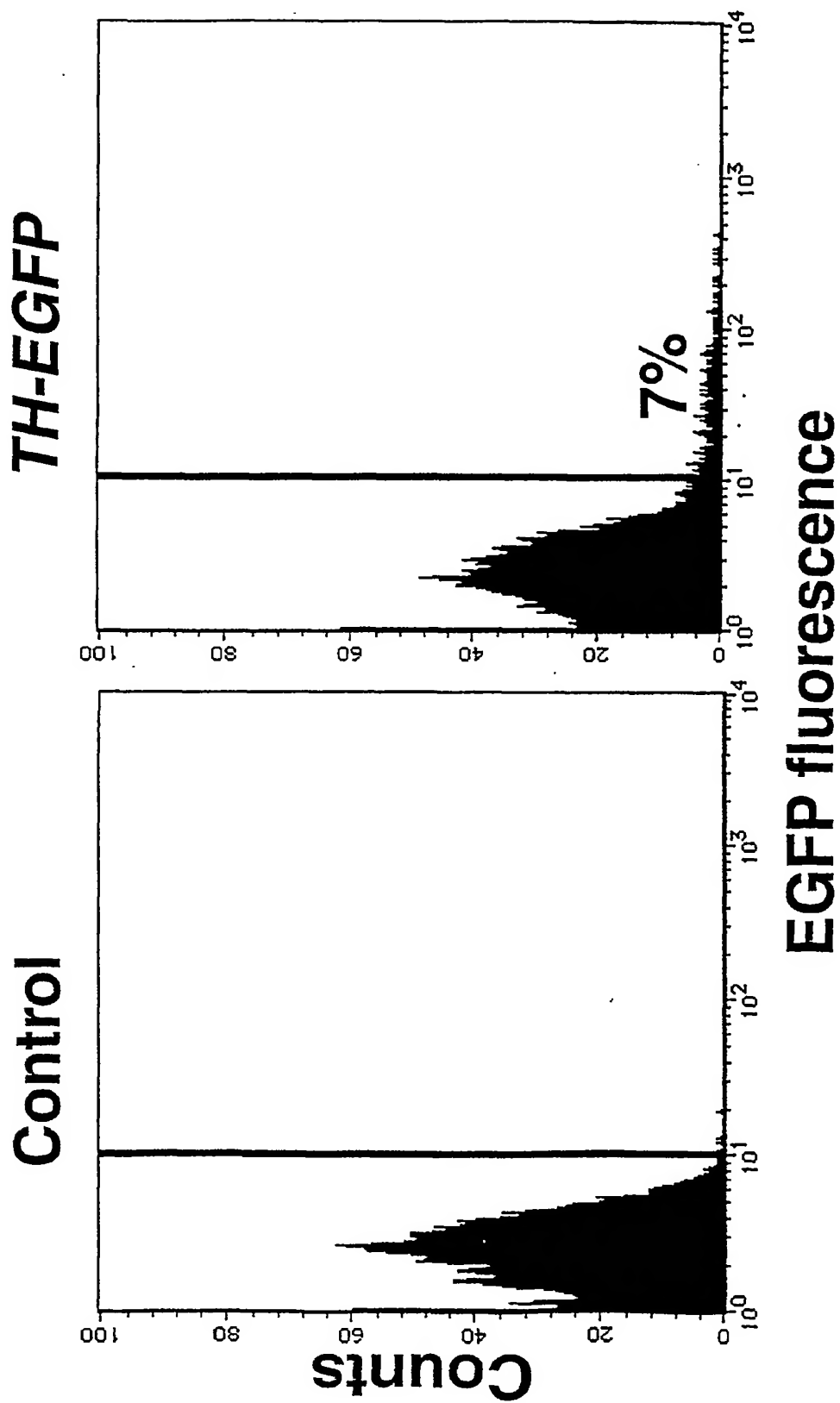
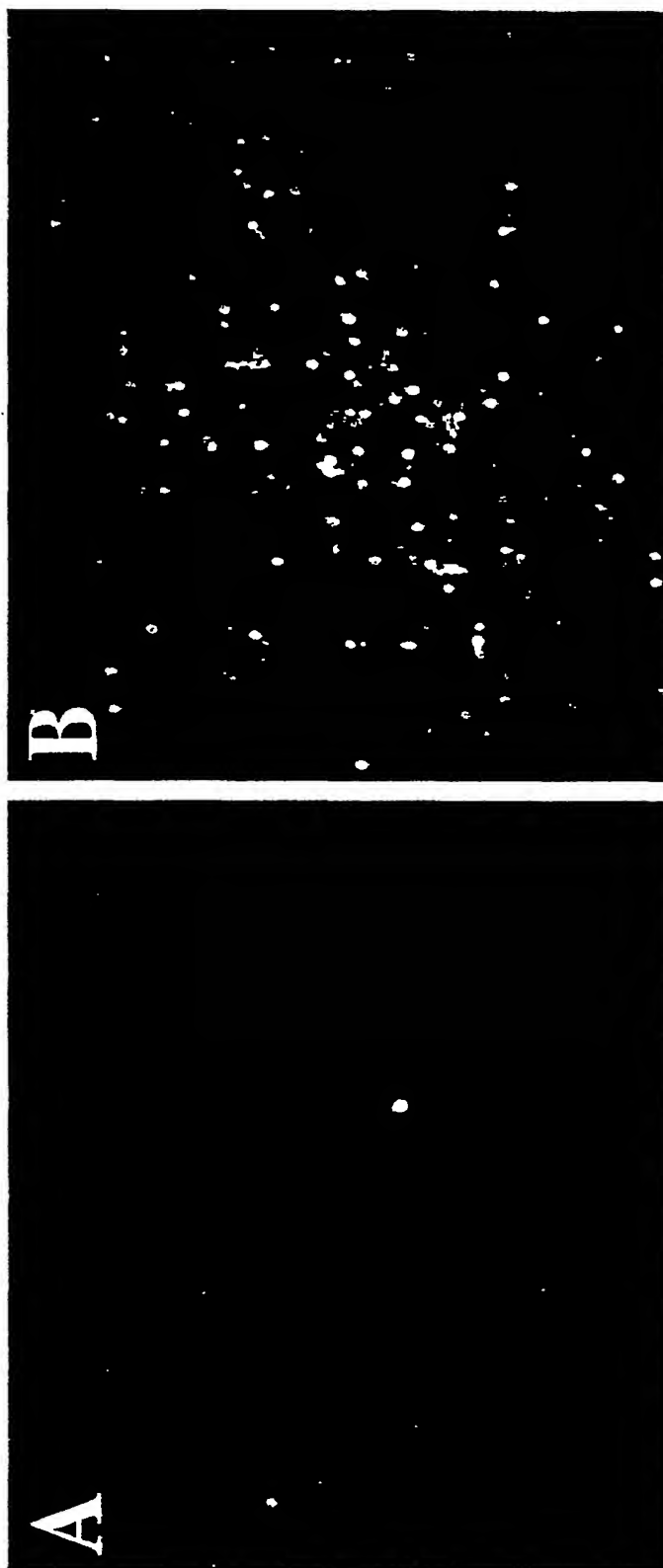


図 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/08674

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N 5/10, C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 5/10, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP, 483014, A (FIDIA SPA), 29 April, 1992 (29.04.92) & JP, 4-262795, A	1-29
A	WO, 98/4688, A1 (BIOPHARM GMBH), 05 February, 1998 (05.02.98) & EP, 922101, A & JP, 2000-516457, A	1-29

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 March, 2001 (06.03.01)

Date of mailing of the international search report
24 April, 2001 (24.04.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 5/10, C12N15/09

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 5/10, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP, 483014, A (FIDIA SPA) 29. 4月. 1992 (29. 04. 92) & JP, 4-262795, A	1-29
A	WO, 98/4688, A1 (BIOPHARM GMBH) 5. 2月. 1998 (05. 02. 98) & EP, 922101, A & JP, 2000-516457, A	1-29

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06. 03. 01

国際調査報告の発送日

24. 04. 01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加藤浩

4B

9050

電話番号 03-3581-1101 内線 3448